

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野）

筋疾患に対するマイオスタチン阻害療法の
臨床応用基盤の確立

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 砂田芳秀

平成 23（2011）年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野）

筋疾患に対するマイオスタチン阻害療法の
臨床応用基盤の確立

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 砂田芳秀

平成 23（2011）年 3 月

目次

I. 総括研究報告

筋疾患に対するマイオスタチン阻害療法の臨床応用基盤の確立

砂田芳秀 1

II. 分担研究報告

1. マイオスタチン阻害ペプチドの臨床応用基盤の確立

砂田芳秀 13

2. 細胞内外のマイオスタチン活性制御因子の作用機序と筋疾患診断治療への臨床応用

土田邦博 17

3. 臨床応用のためのマイオスタチン siRNA デリバリーシステムの開発

野地澄晴 22

4. マイオスタチン作用に拮抗する Wnt ファミリーによる筋疾患の治療

濃野 勉 25

5. 筋ジストロフィー犬での治療効果と安全性の解析

武田伸一 28

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 35

IV. 研究成果の刊行物・別刷 37

I. 總括研究報告

筋疾患に対するマイオスタチン阻害療法の臨床応用基盤の確立

研究代表者 砂田芳秀 川崎医科大学 神経内科学 教授

研究要旨

マイオスタチンは骨格筋量を減少させる骨格筋特異的 TGF- β ファミリー分子で、本研究ではマイオスタチン活性阻害による筋ジストロフィー治療薬の臨床応用基盤の確立を目標としている。マイオスタチンプロドメインの活性阻害領域を特定し、29 アミノ酸からなるペプチド薬を開発した。これをカベオリン 3 欠損肢帯型筋ジストロフィーモデルマウスに局所あるいは全身投与し治療効果を解析した。マイオスタチン受容体（TGF- β タイプ I セリン・スレオニンキナーゼ膜受容体）に対する低分子阻害剤モデルマウスに経口投与し有意な治療効果を達成し、その分子機序として筋芽細胞から筋管細胞への融合・分化促進作用を明らかにした。生体分子ホリスタチンに由来するマイオスタチン阻害分子発現マウスにおいて、骨格筋量増大とともに高脂肪食負荷時に脂肪蓄積が顕著に抑制されることを見出した。マイオスタチン RNA 干渉療法の臨床応用基盤として、アテロコラーゲンを担体として骨格筋への導入効率を高める手法を確立し、治療効果を機能的に解析した。さらにアテロコラーゲンの代替となりうる安価で安全な合成コラーゲンの開発も行った。骨格筋組織内血管近傍の間質に脂肪細胞への分化能を有する間葉系前駆細胞を同定し、脂肪化抑制の新たな治療標的となることが期待される。前臨床治験に用いる筋ジストロフィー犬において、側頭筋が早期から重度に萎縮することを見出した。この知見は治療効果判定など今後の治験プロトコルの開発に役立つことが期待される。

研究分担者

砂田芳秀 川崎医科大学神経内科学・教授
土田邦博 藤田保健衛生大学
総合医科学研究所・教授
野地澄晴 徳島大学大学院ソシオテクノサイエ
ンス研究部・教授
濃野 勉 川崎医科大学分子生物学・教授
武田伸一 国立精神・神経医療研究センター神
経研究所 遺伝子疾患治療研究部・
部長

を創薬標的分子ととらえ、マイオスタチン阻害による筋ジストロフィー治療薬の開発と臨床応用に向けた基盤を確立することを目的とする。われわれは既にマイオスタチンプロドメインやホリスタチンに由来するマイオスタチン阻害ペプチドあるいは組換え蛋白やマイオスタチン siRNA などの治療分子を開発し、培養細胞系への添加実験やマウスへの遺伝子導入で治療効果を確認している。そこで、本研究では筋ジストロフィーモデル動物（マウスあるいはイヌ）にこれらの治療分子を投与して、その治療効果と安全性を評価し、臨床応用の可能性を検討する。また、同時により安全で治療効果の高い新たなマイオスタチン阻害分子の開発に取り組む。その1つは細胞膜上のマイオスタチン受容体である タイプ I セリン・スレオニンキナーゼ膜受容体（ALK5）に対する低分子阻

A.研究目的

筋ジストロフィーは進行性の筋萎縮と筋力低下をきたす予後不良の遺伝性疾患である。ウイルスベクターを用いた遺伝子治療や骨格筋幹細胞による再生治療などが試みられているが、いまだに有効な治療法は確立されていない。本研究は骨格筋量を負に制御するマイオスタチ

害剤(T β RI kinase 阻害剤)である。本来抗がん剤として開発され現在臨床治験が予定されているが、昨年度までの研究で、T β RI kinase 阻害剤経口投与により野生型マウスでは骨格筋が肥大し、筋ジストロフィーモデルマウスでは筋病理変化の改善効果が見られた。そこで臨床応用の基盤となる改善効果の分子機構について検討する。さらに、マイオスタチン活性を阻害した状態で骨格筋以外の臓器におけるエネルギー代謝がどのように変化するか、ホリスタチンに由来するマイオスタチン阻害分子発現マウスを用いて検討する。

細胞間シグナル分子Wnt4がマイオスタチン作用に拮抗し、筋分化増殖活性を有することを見出したので、新たな筋ジストロフィー治療標的分子をとらえて研究を進める。また、マイオスタチン前駆体の活性化プロセッシングに関する furin にも着目し治療標的となる可能性について検討する。

一方、アテロコラーゲンを担体としたマイオスタチン siRNA の全身投与により、筋ジストロフィーモデルマウスでの治療効果が確認されたことから、アテロコラーゲンの代替となりうる安価で安全な合成コラーゲンの開発に取り組む。

B. 研究方法

1. マイオスタチン阻害ペプチド薬の開発

N-末端に細胞膜透過配列を付加した29アミノ酸残基から構成されるプロドメイン由来阻害ペプチド(Rp-29)を合成し、LGMD1Cモデルマウスに腹腔内投与して、経時的に体重、筋力を測定した。7週後に単一筋線維断面積とマイオスタチンの標的遺伝子である p21 の遺伝子発現について解析した。

2. 低分子 T β RI kinase 阻害薬

Ki 化合物投与骨格筋(LGMD1Cモデルマウス、野生型マウス)の筋衛星細胞の動向についてマーカー蛋白質であるM-cadherin免疫染色によって解析した。さらに、Ki化合物投与による筋融合

及び筋分化作用への影響について、*in vitro*細胞融合・分化系を用いて解析した。

3. ホリスタチン由来分子の治療応用

マイオスタチン活性を効率よく阻害するホリスタチン¹改変体(FS I-I, FS-N)を作製し、骨格筋特異的な遺伝子発現マウスを作出した。系統樹立したマウスは、筋肥大を起こし、交配により筋ジストロフィーモデルの病態改善効果を持つことを明らかにして来た。作出したマウスに、生後4週から9週間高脂肪食を負荷して、筋量、脂肪量、肝臓への脂肪の蓄積、耐糖能を検討した。

4. 脂肪細胞分化能を有する間葉系前駆細胞の同定

骨格筋内で脂肪変性や繊維化に関与する細胞を同定するため、マウスの下肢筋からコラゲナーゼ処理で単核細胞を分離し、種々の表面抗原に対する抗体を用いて染色後、FACSセルソーターを用いて細胞を純化した。脂肪分化培地、筋分化培地で培養し、脂肪細胞への分化能を評価した。間葉系幹細胞のマーカーである血小板由来増殖因子受容体 α (PDGFR α)の抗体を用いて純化した細胞が非常に高い脂肪細胞への分化能を有することが示された。同定した細胞が、生体内で実際に脂肪分化することを確認するために、CAGプロモーターの下流にGFPを連結させたGFPマウスから、PDGFR α 陽性細胞を純化した。この細胞を前頸骨筋にグリセロール注射により脂肪変性させた条件下で移植し、分化能を評価した。

5. アテロコラーゲンを担体としたマイオスタチン siRNA 導入の治療効果の検討

筋ジストロフィーモデルマウス(caveolin-3 Tgマウス)及び野生型雄性マウス(C3H)の眼窩下静脈叢にマイオスタチン siRNA とアテロコラーゲン複合体の全身投与を行い、最終投与から1週間の待機期間を経た後、前脛骨筋と咬筋を摘出し、前脛骨筋は張力試験を、咬筋は局所投与の際と同様に形態学的ならびに組織学的解析、機能的解析を行った。

6. 新規合成コラーゲンを担体とした治療効果の検討

野生型 (C57BL/6) 雄性マウスの右側咬筋にマイオスタチン siRNA と特殊加工コラーゲン複合体を局所投与した。対照群として左側咬筋にスクランブル siRNA と特殊加工コラーゲン複合体を局所投与し、形態学的・組織学的解析を行った。

7. 筋芽細胞における Wnt4 の解析

Wnt4 にマイオスタチンと拮抗する作用があり筋分化を促進する活性があること、 β カテニン/TCF 経路に対し拮抗的に働くことから、 β カテニン経路を遮断する低分子阻害薬を用いて C2C12 細胞の筋分化促進作用を検討した。またマウス骨格筋における Wnt4 過剰発現の効果を検証するために、Wnt4 を発現する組換えアデノウイルスを作成した。

8. 骨格筋における furin の解析

Furin 遺伝子のコンディショナル変異マウスと Myf5 系譜の筋衛星細胞において Cre 酵素を発現し furin 遺伝子が破壊されたマウスを作出した。さらに Cre 酵素特異的に β ガラクトシダーゼ遺伝子を発現する Rosa26Cre reporter マウスと交配し、Furin 遺伝子が破壊されている Myf5 系譜の骨格筋と筋線維について解析した。

9. 筋ジス犬における側頭筋および下腿筋量の定量評価

筋ジス犬における骨格筋萎縮について 3MRI を用いた定量的 volume 評価を行った。対象には 2 ヶ月齢の正常犬 3 頭、筋ジス犬 1 頭を用い、7 ヶ月齢まで 1 ヶ月ごとに下腿・頭部の MRI 撮像を行った。得られた MR 画像より画像解析ソフトである OsiriX (Version 3.8.1; OsiriX Foundation) を用いて側頭筋、前脛骨筋、及び腓腹筋の断面積の経時的測定を行った。

C. 研究結果・考察

1. マイオスタチン阻害ペプチド薬 Rp-29 全身投与による治療効果

10 週齢 LGMD1C モデルマウスの腹腔内に Rp-29

ペプチド投与を行った。6 週間の検討ではコントロール (Rev-Rp-29) と比較して体重、筋力の増加は認められなかった。12 週齢では、各骨格筋重量、及び単一筋線維断面積の増大はなく、有意な治療効果は得られなかった。

2. 低分子 T β RI kinase 阻害剤投与によるマウス骨格筋筋衛星細胞の増加、筋芽細胞融合・分化系促進

LGMD1C モデルマウス及び野生型マウスに Ki 化合物を投与し、筋衛星細胞数を解析した。Ki 化合物投与群では、野生型マウス、LGMD1C モデルマウスとも有意に増加が認められた。また、マイオスタチン、アクチビン、TGF- β 1 を C2C12 筋芽細胞に高発現させると、細胞融合・分化系は著明に抑制された。一方この系に TBRI kinase 阻害剤 (Ki 化合物) を添加したところ、コントロール C2C12 細胞とほぼ同等まで細胞融合・分化が回復した。

3. マイオスタチン阻害による脂肪代謝への影響

野生型マウスに比して、ホリスタチン由来分子によりマイオスタチン阻害された際には、高脂肪食負荷時に、筋量のさらなる増加と脂肪量の蓄積の低下が確認された。高脂肪食による脂肪細胞肥大は抑制傾向にあり、インスリン抵抗性や耐糖能の改善が認められた。血中の中性脂肪やコレステロール値は低下し、アディポネクチンは増加していた。リン酸化 Smad3 を指標としてマイオスタチンシグナルを評価した結果、骨格筋でのみマイオスタチンシグナルが低下していた。従って、筋量が増加することで、二次的に脂肪細胞や肝臓細胞での脂肪動態に変化が生じることを明らかにした。

4. 骨格筋内の間葉系前駆細胞の同定

骨格筋内に存在する単核細胞の中で、PDGFR α 陽性の間葉系前駆細胞が、増殖能が高くインスリン添加のみで脂肪細胞へ効率よく分化した。移植実験では、脂肪変性環境下では脂肪分化を示した。しかしながら、カルジオトキシン処理による筋再生条件下では脂肪に分化しなかった

ことから、細胞がおかれる微小環境が、PDGFR α 細胞の運命決定に重要な役割を果たすことが示された。脂肪変性が生じる時期に呼応して、PDGFR α 陽性が見られたことから、同定した細胞は筋ジストロフィー病態で見られる脂肪細胞を供給する細胞であることが強く示唆された。

5. マイオスタチン siRNA 導入による筋張力の改善効果

変異 caveolin-3Tg マウスに対する全身投与では投与前後での体重、握力には有意差がなかったが、caveolin-3Tg マウスにおいて張力検査による筋機能解析の結果、マイオスタチン-siRNA とアテロコラーゲン複合体投与群において対照群の約3倍の張力増加が見られた。また、その回復した張力は野生型(C3H)マウスの約55%に達することが認められた。

6. 新規合成コラーゲンによる siRNA 導入

新規合成コラーゲン SYCOL を用いてマイオスタチン-siRNA をマウス咬筋に局所投与し、その影響を調べた結果、アテロコラーゲンと同様に一度投与しただけで、2週間後には肉眼的に筋肉の増大を確認できた。*Mst*-siRNA と SYCOL の複合体投与の右側咬筋は、対照側と比較して筋重量、筋線維断面積ともに有意に増加し、mRNA の発現も有意に減少していた。また、SYCOL と ATCOL の mRNA サイレンシング能は同等の結果となった。

7. Wnt4 による筋分化の誘導

C2C12 細胞を使って Wnt4 の細胞内シグナルについて解析したところ、Wnt4 は β カテニン TCF 経路を介さず、逆に Wnt3a による β カテニン TCF 経路の促進作用を抑制することが明らかになった。またマイクロアレイにより内在の遺伝子発現プロファイルを解析すると、筋分化に伴って β カテニン/TCF の直接的な標的遺伝子である *cyclinD1* と *c-myc* の転写が抑制されることから、Wnt4 による筋分化の誘導は、 β カテニン TCF 経路を阻害することにより筋芽細胞の分化を制御していることが裏付けられた。

8. 骨格筋における furin の解析

furin 遺伝子のコンディショナル変異マウスを、筋衛星細胞で Cre 酵素を発現する Myf5-Cre マウスと交配すると、雄のマウスで、対照群と比べ体重が3割ほど少なく成長速度が低下した。

9. 筋ジストロフィーの側頭筋萎縮

経時的 MR 撮像による側頭筋萎縮の定量的評価により、筋ジストロフィー犬の側頭筋における筋萎縮が他の下腿骨格筋よりも重度に進行することが示された。

D. 考察

マイオスタチン阻害ペプチド薬全身投与では筋萎縮・筋力低下の改善は得られなかった。この原因として、ペプチドが容易に分解を受ける、あるいはペプチドが骨格筋へ到達されていない等が想定される。今後、ペプチド分解を避けるような改良が必要である。

今回 T β RI kinase 阻害剤が、成人骨格筋の組織幹細胞である筋衛星細胞数を増加させること、広範な TGF- β ファミリー分子によるマウス筋芽細胞 C2C12 分化抑制を強力に阻害することを証明した。従ってこの阻害剤は、筋ジストロフィーのみでなく癌悪疫質などの筋消耗性疾患、正常人の老化による筋萎縮などでも、幹細胞レベル及び筋芽細胞レベルの双方で筋萎縮阻害作用を有すると考えられる。

マイオスタチン阻害により、脂肪細胞が肥大化せず、高脂肪食を負荷しても、脂肪量の増加や脂肪肝の形成は抑制されていた。耐糖能やインスリン感受性も対照と比較して良好であったことから、メタボリック症候群の病態改善にも応用できることが期待される。

RNA 干渉の臨床応用において siRNA のデリバリーシステムの開発が進められているが、血中あるいは組織中において siRNA の安定化は困難だと考えられてきた。本研究でコラーゲンナノ粒子を担体として用いると、高い導入効率と1週間を超える持続時間を達成することに成功した。筋ジストロフィー以外の幅広い疾患の治療へ

の応用も期待される。

Wnt4 及び低分子阻害薬 FH535 により、 β カテニン/TCF による遺伝子発現が抑制されると、筋分化を促進することがわかった。筋細胞の領域特異的な furin 遺伝子の破壊による局所的な筋肥大効果については、様々な筋ジストロフィーの病態と関連している可能性が示唆される。

E. 結論

- (1) マイオスタチン阻害ペプチド Rp29 を筋ジストロフィーモデルマウスの腹腔内へ全身投与したが、筋萎縮の改善効果は得られなかった。
- (2) TGF- β タイプ I セリン・スレオニンキナーゼ膜受容体に対する低分子阻害剤には筋衛星細胞の増加作用、筋芽細胞の融合・分化促進作用があり、筋萎縮改善の分子基盤となっていることを明らかにした。
- (3) マイオスタチン阻害により脂肪蓄積量の抑制、インスリン抵抗性の改善が得られることを明らかにした。
- (4) 骨格筋内で脂肪細胞への分化能を有する間葉系前駆細胞の存在を同定し、筋ジストロフィー病態で見られる脂肪細胞を供給する細胞であることが示された。
- (5) アテロコラーゲンを担体としたマイオスタチン siRNA 導入により、筋ジストロフィーモデルマウスの筋張力の大幅な改善に成功した。
- (6) マイオスタチン活性に影響を及ぼす Wnt4 が筋分化を促進することを明らかにした。

F. 健康危険情報 該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hayashi S, Ohsawa Y, Takahashi T, Suzuki N, Okada T, Rikimaru M, Murakami T, Aoki M, Sunada Y : Rapid Screening for Japanese Dysferlinopathy by Fluorescent Primer Extension. *Int.Med.* 49, 2010
- 2) Ageta H, Ikegami S, Miura M, Masuda M,

Migishima R, Hino T, Takashima N, Murayama A, Sugino H, Setou M, Kida S, Yokoyama M, Hasegawa Y, Tsuchida K, Aosaki T, Inokuchi K. Activin plays a key role in the maintenance of long-term memory and late-LTP. *Learning and Memory*. 17(4):176-185, 2010

3) S.-J. Lee, Y.-S. Lee, T. A. Zimmers, A. Soleimani, M. M. Matzuk, Tsuchida K, R. D. Cohn, E. R. Barton. Regulation of muscle mass by follistatin and activins. *Mol. Endocrinol.* 24(10):1998-2008, 2010

4) Ishikawa M, Nishijima M, Shiota J, Sakagami H, Tsuchida K, Mizukoshi M, Fukuchi M, Tsuda M, Tabuchi A. Involvement of the SRF coactivator megakaryoblastic leukemia in the activin-regulated dendritic complexity of rat cortical neurons. *J. Biol. Chem.* 285(43): 32734-32743, 2010

5) Ageta H, Tsuchida K. Multifunctional roles of activins in the brain. *Vitamins and Hormones* Vol. 85: 185-206, 2011

6) Nakatani M, Kokubo M, Ohsawa Y, Sunada Y, Tsuchida K. Follistatin-derived peptide expression in muscle decreases adipose tissue mass and prevents hepatic steatosis. *Am. J. Physiol. Endocrinol & Metabol.* 300 (3): E543-553, 2011

7) Adachi T, Kawakami E, Ishimaru N, Ochiya T, Hayashi Y, Ohuchi H, Tanihara M, Tanaka E, Noji S. Delivery of small interfering RNA with a synthetic collagen poly(Pro-Hyp-Gly) for gene silencing in vitro and in vivo. *Dev Growth Differ.* 52(8):693-699, 2010

8) Kawakami E, Kinouchi N, Adachi T, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Tanaka E, Noji S. Atelocollagen-mediated systemic administration of myostatin-targeting siRNA improves muscular atrophy in caveolin-3-deficient mice. *Dev Growth Differ.* 53(1):48-54, 2011

9) Yada E, Motohashi N, Harano C, Segawa M, Bo W, Wada MR, Yoshida M, Nakagawa R, Masuda S, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells from adult mdx mice (投稿中)

10) Shin J.H, Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Ohshima S, Kinoshita K, Chiyo T, Okada H, Okada T, Takeda S:

Improvement of cardiac fibrosis in dystrophic mice by rAAV9-mediated microdystrophin transduction. *Gene Ther.* (in press)

11) Nakamura A, Takeda S : Mammalian models of duchenne muscular dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications. *J Biomed Biotechnol.* (in press)

12) Fukaya M, Kamata A, Hara Y, Tamaki H, Katsumata O, Ito N, Takeda S, Hata Y, Suzuki T, Watanabe M, Harvey RJ, Sakagami H: SynArfGEF is a guanine nucleotide exchange factor for Arf6 and localizes preferentially at post-synaptic specializations of inhibitory synapses. *J Neurochem.* 116:1122-1137, 2011

13) Shimizu N, Yoshikawa N, Ito N, Maruyama T, Suzuki Y, Takeda S, Nakae J, Tagata Y, Nishitani S, Takehana K, Sano M, Fukuda K, Suematsu M, Morimoto C, Tanaka H : Crosstalk between Glucocorticoid Receptor and Nutritional Sensor mTOR in Skeletal Muscle. *Cell Metab.* 13:170-182, 2011

14) Lu QL, Yokota T, Takeda S, Garcia L, Muntoni F, Partridge T : The status of exon skipping as a therapeutic approach to duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther.* 19:9-15, 2011

15) Yokota T, Hoffman E, Takeda S : Antisense oligo-mediated multiple exon skipping in a dog model of duchenne muscular dystrophy. *Methods Mol Biol.* 709:299-312, 2011

16) Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Gene therapy for muscle disease. *Exp Cell Res.* 316: 3087-3092, 2010

17) Aoki Y, Nakamura A, Yokota T, Saito T, Okazawa H, Nagata T, Takeda S : In-frame dystrophin following exon 51-skipping improves muscle pathology and function in the exon 52-deficient mdx mouse. *Mol Ther.* 18, 1995-2005, 2010

18) Kanagawa M, Omori Y , Sato S, Kobayashi K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Endo T, Furukawa T, Toda T : Post-translational Maturation of Dystroglycan Is Necessary for Pikachurin Binding and Ribbon Synaptic Localization. *J Biol Chem.* 285:31208-31216, 2010

19) Suzuki N, Mizuno H, Warita H, Takeda S, Itoyama Y, Aoki M : Neuronal NOS is dislocated during muscle atrophy in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 294: 95-101, 2010

20) Sugita H, Takeda S: Progress in muscular

dystrophy research with special emphasis on gene therapy. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 86:748-56, 2010

21) Saito T, Nakamura A, Aoki Y, Yokota T, Okada T, Osawa M, Takeda S: Antisense PMO Found in Dystrophic Dog Model Was Effective in Cells from Exon 7-Deleted DMD Patient. *PLoS One.*:5(8). pii: e12239, 2010

22) Masamizu Y, Okada T, Ishibashi H, Takeda S, Yuasa S, Nakahara K: Efficient gene transfer into neurons in monkey brain by adeno-associated virus 8. *Neuroreport.* 21:447-451, 2010

23) Yajima H, Motohashi N, Ono Y, Sato S, Ikeda K, Masuda S, Yada E, Kanesaki H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Kawakami K: Six family genes control the proliferation and differentiation of muscle satellite cells. *Exp Cell Res.* 316: 2932-2944, 2010

24) Fukada S, Morikawa D, Yamamoto Y, Yoshida T, Sumie N, Yamaguchi M, Ito T, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Yamamoto H : Genetic background affects properties of satellite cells and mdx phenotypes. *Am J Pathol.* 176: 2414-2424, 2010

【欧文著書】

25) Okada T, Takeda S: Advances in molecular therapy research on dystrophin-deficient muscular dystrophy. In, *Gene Therapy and Regulation* (ed. by Roger Bertolotti), World Scientific, NJ. 2010, 5(1), pp113-123.

26) Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: *Mechanobiology in skeletal muscle: conversion of mechanical information into molecular signal.* *Mechanosensing Biology* (ed. Masaki Noda), Springer Japan, pp1-219, 2010

【和文著書】

27) 砂田芳秀:筋ジストロフィーの分子病態. 神経治療学, Vol.27, No.3, 338, 2010

28) 上住聡芳, 中谷直史, 常陸圭介, 土田邦博 老化や疾患における骨格筋の萎縮と治療への応用. 基礎老化学会誌, 34(4), 5-11, 2010

29) 野地澄晴, 足立太郎, 川上恵実, 田中栄二, RNA 干渉法による治療を実現するための研究.

中・四国矯正歯科学会雑誌, 22, 3-8, 2010

30) 武田伸一: 筋ジストロフィーの新しい治療戦略. 神経治療学, Vol.27, No.6, PP788-790, 2010

31) 鈴木友子, 武田伸一: 筋ジストロフィーモデルマウス. 完全版マウス・ラット疾患モデル活用ハンドブック, 株式会社羊土社, PP378-393, 2011

【和文総説】

32) 小林正典, 武田伸一: 筋ジストロフィーのエクソン・スキップによる分子治療. 医学のあゆみ (in press)

33) 鈴木友子, 武田伸一: 筋ジストロフィー. 総合リハビリテーション, Vol.39, No.1, pp25-29, 2011

34) 青木吉嗣, 武田伸一: デュシェンヌ型筋ジストロフィーのエクソン・スキッピング療法. 神経難病の最新治療法 [第1部], 難病と在宅ケア, Vol.16, No.6, PP6-9, 2010

35) 清水裕子, 武田伸一: 筋ジストロフィーの分子治療. —遺伝子診断の進歩とゲノム治療の展望—, 遺伝子診療学(第2版)68巻 増刊号8, PP650-653, 2010

2. 学会発表

1) Sunada Y, Ohsawa Y, Fujino M, Okada T, Hayashi S, Rikimaru M, Murakami T, Nishimatsu S, Nohno T, Nagao M: Wound-healing MRL-MpJ phenotype improves outcome of dystrophin deficient mdx mice. XII International Congress on Neuromuscular Diseases, Naples, Italy, 2010

2) 砂田芳秀: nNos は caveolin-3 欠損症の病態を抑制する. 第 51 回日本神経学会総会, 東京, 5.21.2010

3) 砂田芳秀: 筋ジストロフィーの分子病態. 第 28 回日本神経治療学会総会, 横浜, 7.16.2010

4) 砂田芳秀, 大澤 裕, 岡田只士, 西松伸一郎, 石崎雅俊, 菅 智宏, 内野 誠, 濃野 勉, 野地澄晴, 土田邦博: 筋ジストロフィーに対する抗 myostatin 治療薬の開発, 厚生労働省精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究」平成 22 年度「砂田班」班会議, 東京, 12.3.2010

5) 土田邦博: 骨格筋と脂肪細胞の相互作用解析と筋疾患治療への応用. (独) 東京都健康長寿医療センター研究所, 理研播磨研究所合同公開カンファレンス, 東京, 4.12.2010

6) Tsuchida K. Neuromuscular diseases and behavior of progenitor cells. The 3rd Pan Pacific Symposium on Stem Cells Research. Taiwan, April 16-19, 2010

7) 常陸圭介, 土田邦博: マイオスタチン欠損骨格筋肥大におけるマイクロ RNA の役割. 第 2 回日本 RNAi 研究会, 広島, 8.26-28.2010

8) 上田洋司, 井ノ口馨, 土田邦博: 新しい躁鬱病モデル動物を用いたプロテオミクス解析.

Neuro2010 第 3 3 回日本神経科学大会, 神戸, 9.2-4. 2010

9) 土田邦博, 中谷直史, 常陸圭介, 上住聡芳, 上田洋司, 武田伸一, 大澤裕, 砂田芳秀: 骨格筋の増殖分化調節因子の生理作用を基にした筋ジストロフィーの病態解明と治療法の開発, 厚生労働省精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究」平成 22 年度「砂田班」班会議, 東京, 12.3.2010

10) Ishikawa M, Nishijima N, Shiota J, Sakagami H, Tsuchida K, Mizukoshi M, Fukuchi M, Tsuda M, Tabuchi A. Actin-binding coactivator MKL is involved in activin-induced transcriptional activity and alteration of dendritic morphology in rat cortical neurons. BMB2010 第 3 3 回日本分子生物学会年回、第 8 3 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 12.7-10. 2010

11) 土田邦博: 骨格筋と脂肪細胞の臓器間クロストークによる脂肪細胞の動態解析. 第 7 回宮崎サイエンスキャンプ, 宮崎, 2.25-27. 2011

12) Kawakami E, Kinouchi N, Adachi T, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Tanaka E, Noji S: Special processed collagen-mediated application of myostatin-siRNA for muscular atrophy diseases. 88th IADR, Barcelona, Spain, July 14-17, 2010

13) Kinouchi N, Kawakami E, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Tanaka E, Noji S: Atelocollagen-mediated systemic administration of myostatin siRNA improves muscular dystrophy. 88th IADR, Barcelona, Spain, July 14-17, 2010

14) Uezumi A, Fukada S, Yamada H, Takeda S, Tsuchida K: Mesenchymal progenitors distinct from muscle satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle, Keystone Symposia, Santa Fe, USA, 2.2, 2011

15) Imamura M, Matsumoto H, Inaba Y, Mannen H, Takeda S: Generation of transgenic mouse expressing mutated wwpl gene responsible for chicken muscular dystrophy. The American Society For Cell Biology, 50th

- Annual meeting, Philadelphia, USA, 12.14,2010
- 16) Ono Y, Luisa Boldrin, Paul Knopp, Jennifer E. Morgan, Peter S. Zammit, Yuko Miyagoe-Suzuki, Takeda S: Molecular aspects of functional heterogeneity in muscle satellite cells. BIT Life Sciences' 3rd Annual World Congress of regenerative medicine & Stem Cells. Shanghai, China , 12.5, 2010
- 17) Nakamura H, Nishino I, Komaki H, Mori M, Ooya Y, Motoyoshi Y, Matsumura T, Takeda S, Kawai M: REMUDY—DMD/BMD patient registry in Japan.15th International Congress of World Muscle Society (WMS), Kumamoto, 10.15, 2010
- 18) Shimizu Y, Saito T, Aoki Y, Yokota T, Nagata T, Nakamura A, Osawa M, Takeda S: Skipping of exons 6 and 8 of the DMD gene has been achieved in myogenic cells from an exon-7 deleted DMD patient: direct application of antisense sequences found in study with canine muscular dystrophy.15th International Congress of World Muscle Society (WMS), Kumamoto, 10.15, 2010
- 19) Kanagawa M, Omori Y, Kobayashi K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Endo T, Furukawa T, Toda T : Disruption of dystroglycan-pikachurin interaction underlies the molecular pathogenesis of eye abnormalities in dystroglycanopathy. 15th International Congress of World Muscle Society (WMS), Kumamoto, 10.13, 2010
- 20) Wang B, Segawa M, Hrano C, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S : Impact of age on generation of iPSCs from mdx mouse fibroblast cells, ISSCR 8th Annual Meeting, CA, USA, 6.19, 2010
- 21) Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K : rAAV8-mediated protein-anchoring therapy for targeting collagen Q-tailed acetylcholinesterase to the neuromuscular junction. American society of gene & cell therapy 13th Annual meeting, Washington, DC, USA, 5.22, 2010
- 22) Kinoh H, Yugeta N, Okada H, Kasahara Y, Okada T, Takeda S: Induction of oral immunotolerance to rAAV9-microdystrophin in canine X-linked muscular dystrophy. American Society of Gene & Cell Therapy 13th Annual Meeting, Washington, DC, USA, 5.22, 2010
- 23) Aoki Y, Yokota T, Saito T, Nakamura A, Nagata T, Okazawa H, Takeda S : Feasibility and effectiveness of exon 51 skipping in human-like mdx mutation. American society of gene & cell therapy 13th Annual meeting, Washington DC, USA, 5.21, 2010
- 24) Kasahara Y, Kinoh H, Okada H, Shin JH, Nishiyama A, Hosoyama S, Maeda M, Nakamura A, Okada T, Takeda S: Cell therapeutic approach to Duchenne muscular dystrophy using myogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells. American society of gene & cell therapy 13th Annual meeting, Washington DC, USA, 5.20, 2010
- 25) Yokota T, Saito T, Urasawa N, Nagata T, Nakamura A, Kole R, Sazani P, Partridge T, Takeda S, Hoffman E : Multiple exon-skipping using cell-penetrating morpholinos for dystrophic dogs. American society of gene & cell therapy 13th Annual meeting, Washington DC, USA, 5.20, 2010
- 26) Hoffman E , Yokota T, Lu QL, Partridge T, Takeda S : Systemic anti-sense in DMD: Progress, and hurdles facing clinical implementation of exon-skipping. The Ottawa conference on new directions in biology & disease of skeletal muscle, Ottawa, Canada, 5.6, 2010
- 27) 伊藤尊仁, 米田智廣, 清水菜津子, 上住聡芳, 土田邦博, 鈴木友子, 武田伸一, 山元弘, 辻川和文, 深田宗一郎 : PDGFR α 陽性間葉系前駆細胞は病態形成・再生促進の2つの作用を有する. 第10回日本再生医療学会総会, 東京, 3.2,2011
- 28) 兼先宏典, 高橋永幸, 亀谷修平, 高橋浩, 工藤明, 鈴木友子, 武田伸一 : POMGnT1欠損型マウスではアストロサイトの増殖に伴って網膜剥離が生ずる. 第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生科学会大会合同大会, 神戸, 12.10, 2010
- 29) 伊藤尚基, 工藤明, 鈴木友子, 武田伸一 : 骨格筋神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) 過負荷によって活性化され, タンパク質合成の活性化を介して筋肥大の進行を制御している. 第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生科学会大会合同大会, 神戸, 12.8, 2010
- 30) 矢島浩, 小野悠介, 鈴木友子, 武田伸一 : Six 遺伝子群による筋衛星細胞の増殖・分化制御. 第33回日本分子生物学会年会, 第83回日本生科学会大会合同大会, 神戸, 12.8, 2010



- 31) 清水宣明, 吉川賢忠, 丸山崇子, 田形勇輔, 竹鼻健司, 伊藤尚基, 武田伸一, 佐野元昭, 福田恵一, 森本幾夫, 田中廣壽: グルココルチコイドによる転写因子 KLF15 の骨格筋特異的発現活性化の意義. 第 33 回日本分子生物学会年会, 第 83 回日本生科学会大会合同大会, 神戸, 12.7, 2010
- 32) 小野悠介, 伊藤尚基, 鈴木友子, 武田伸一: 筋衛星細胞集団から自己複製細胞を予期的に同定分離する方法. 第 65 回日本体力医学会大会, 千葉, 9.17, 2010
- 33) 伊藤尚基, 鈴木友子, 武田伸一: 骨格筋神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)は過負荷によって活性化され、タンパク質合成の制御を介して筋肥大を促進する. 第 65 回日本体力医学会大会, 千葉, 9.16, 2010
- 34) 正水 芳人, 岡田 尚巳, 川寄 圭祐, 石橋 英俊, 武田 伸一, 湯浅 茂樹, 長谷川 功, 中原 潔: 霊長類中枢神経系への遺伝子導入: アデノ随伴ウイルスベクターによる神経細胞への順行性および逆行性感染. Neuro 2010, 神戸, 9.2, 2010
- 35) 王博, 伊藤尚基, 鈴木友子, 武田伸一: Impact of age on generation of iPSCs from mdx mouse fibroblast cells 第 31 回日本炎症・再生医学会, 新宿, 8.5, 2010
- 36) 伊藤尚基, 工藤明, 鈴木友子, 武田伸一: 骨格筋神経型一酸化窒素合成酵素は過負荷によって活性化され、タンパク質合成・分解の制御を介して筋肥大を促進する. 第 31 回日本炎症・再生医学会, 新宿, 8.5, 2010
- 37) Wang B, Segawa M, Hrano C, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S: Impact of age on generation of iPSCs from mdx mouse fibroblast cells : Poster, The 8th Stem cell research symposium , Awaji, 5.14, 2010

【特別講演・シンポジウム】

- 38) 武田伸一, 伊藤尚基, 鈴木友子: nNOS は筋萎縮と筋肥大を制御するメカノセンサーである. 第 33 回日本分子生物学会年会, 第 83 回日本生科学会大会合同大会, 神戸, 12.7, 2010
- 39) Takeda S : Molecular Characterization of Stem Cells in Skeletal Muscle. 8th RCGM International Symposium of Academic Frontier, Saitama, 11.3, 2010
- 40) 武田伸一: 筋ジストロフィーに対するエクソン・スキップ治療. 厚生労働科学研究費 成果発表シンポジウム, 埼玉, 10.23, 2010
- 41) 武田伸一: 特別講演 筋ジストロフィーに対する治療は、どこまで近づいているのか. 世界筋学会熊本開催記念・筋ジストロフィー治療市民公開

- 講座, 熊本, 10.11, 2010
- 42) 武田伸一: 特別講演 筋ジストロフィーに対する新しい治療戦略. 第 121 回信州小児臨床談話会, 松本, 10.2, 2010
- 43) 武田伸一: The significance of exons skipping therapy in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. Japan-Canada Joint Mini-Symposium; "Translational Neurosciences; current topics and future perspectives", Neuro 2010 第 33 回日本神経科学大会, 第 53 回日本神経化学会大会, 第 20 回日本神経回路学会大会 合同大会, 神戸, 9.2, 2010
- 44) 武田伸一: 筋ジストロフィーに対する新たな治療の展開. 愛媛大学プロテオ医学研究センター学術講演会, 松山, 8.30, 2010
- 45) 武田伸一: 独立行政法人国立精神・神経医療研究センターと筋ジストロフィーの治療法開発, 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーの臨床試験実施体制構築に関する研究班」(主任研究者: 川井充) 平成 22 年度 ワークショップ, 東京, 8.7, 2010
- 46) 武田伸一: 筋ジストロフィー症の新しい治療戦略. 第 28 回日本神経治療学会総会, 横浜, 7.15, 2010
- 47) 武田伸一: Advances of molecular therapy research on dystrophin-deficient muscular dystrophy. 第 16 回日本遺伝子治療学会, 栃木, 7.1, 2010
- 48) 武田伸一: Duchenne 型筋ジストロフィーに対する分子治療学の進歩. 第 52 回日本小児神経学会総会, 福岡, 5.21, 2010
- 49) 武田伸一: 筋萎縮と筋肥大の分子機構を巡って Molecular mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy. 第 3 回上肢の神経機能回復セミナー, 秋田, 5.14, 2010

【その他】

- 50) 砂田芳秀, 土田邦博, 野地澄晴, 濃野 勉, 武田伸一: 筋疾患に対するマイオスタチン阻害療法の臨床応用基盤の確立. リサーチミーティング, 厚生労働科学研究費補助金 障害者対策総合研究事業 (主任研究者: 砂田芳秀), 平成 22 年度 リサーチミーティング, 岡山, 6.4, 2010
- 51) 武田伸一, 青木吉嗣, 清水裕子, 横田俊文, 中村昭則, 永田哲也: モルフォリノが筋線維に取り込まれる分子機構の解明. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一) 平成 22 年度班会議, 東京, 12.14, 2010
- 52) 武田伸一, 喜納裕美, 弓削田直子, 岡田浩典,

笠原優子, 千代智子, 岡田尚巳: AAV ベクターを用いた筋ジストロフィー犬胎仔遺伝子導入と機能解析. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成 22 年度班会議, 東京, 12.14, 2010

53) 裏出良博, 有竹浩介, 鎌内慎也, 永田奈々恵, 小林正典, 武田伸一: 筋ジストロフィーの進行性軽減療法の開発〜プロスタグランジン(PG)D2 情報伝達制御による筋ジストロフィーの 2 次炎症軽減と尿中 PGD2 代謝物を対象とした病態進行マーカーの開発〜. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成 22 年度班会議, 東京, 12.14, 2010

54) 武田伸一, 小林正典, 中村昭則, 湯浅勝敏, 弓削田直子, 岡田尚巳, 永田哲也, 高橋明男: 筋ジストロフィー犬新生仔の蘇生前後の分子病態に関する研究. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成 22 年度班会議, 東京, 12.14, 2010

55) Takeda S, Wang B, Ito N, Ono Y, Kawaguchi N, Kanesaki H, Suzuki Y: Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from muscle-derived fibroblasts at different ages of mdx mice. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成 22 年度班会議, 東京, 12.13, 2010

56) 上住聰芳, 深田宗一郎, 山本直樹, 山田治基, 西野一三, 武田伸一, 土田邦博: 骨格筋内在性間葉系前駆細胞の筋ジストロフィー病態への関与. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成 22 年度班会議, 東京, 12.13, 2010

57) 深田宗一郎, 山口賢彦, 小久保博樹, 小川 遼, 上住聰芳, 伊藤尊仁, 辻川和丈, 山元 弘, 鈴木友子, 武田伸一: 骨格筋幹細胞移植実現を目指した基盤的研究〜Hesr1/3 は骨格筋幹細胞の成立・維持に必須である〜. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成 22 年度班会議, 東京, 12.13, 2010

58) 二川 健, 河野尚平, 原田晃子, 松尾侑季, 中屋 豊, 東端 晃, 奥村裕司, 武田伸一: SPORTS ラット(自発性高運動ラット)の筋肉特性と宇宙実験(MyoLab)の途中経過. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」(主任研究者 武田伸一)平成

22 年度班会議, 東京, 12.13, 2010

59) 川上潔, 矢嶋浩, 佐藤滋, 池田啓子, 小野悠介, 鈴木友子, 武田伸一: Six 遺伝子群による筋衛星細胞の増殖・分化の制御および筋再生へのかかわり. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究」(主任研究者 砂田芳秀)平成 22 年度班会議, 東京, 12.4, 2010

60) 松村喜一郎, 齊藤史明, 萩原宏毅, 金川基, 兼先宏典, 大熊文美, 池田美樹, 真先敏弘, 鈴木友子, 武田伸一, 戸田達史, 清水輝夫: Large に関連する α -dystroglycan のプロセッシングとその効用. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究」(主任研究者 砂田芳秀)平成 22 年度班会議, 東京, 12.3, 2010

61) 遠藤玉夫, 萬谷博, 赤阪啓子, 鈴木友子, 武田伸一: α -ジストログリカノパチーの病態解明に関する研究. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究」(主任研究者 砂田芳秀)平成 22 年度班会議, 東京, 12.3, 2010

62) 青木正志, 高橋俊明, 鈴木直輝, 堅山真規, 割田仁, 八木沼智香子, 早坂美保, 佐藤仁美, 菅原瞳, 伊藤真理子, 阿部恵美, 吉岡勝, 今野秀彦, 小野寺宏, 武田伸一, 林由起子, 西野一三, 糸山泰人: ジスフェルリノパチー病態の解明およびその治療に関する研究. 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究」(主任研究者 砂田芳秀)平成 22 年度班会議, 東京, 12.3, 2010

63) 武田伸一: DMD 筋ジストロフィーの最新治療. 第 7 回筋ジストロフィーのピアカウンセラー養成講座—デュシェンヌ型を中心として—, 東京, 10.31, 2010

64) 喜納裕美, 岡田浩典, 笠原優子, 千代智子, 岡田尚巳, 武田伸一: AAV ベクターを用いた筋ジストロフィー犬胎仔遺伝子導入と機能解析. 第 5 回 筋ジストロフィー治療研究発表会, 鳴子, 10.30, 2010

65) 青木吉嗣, 清水裕子, 横田俊文, 永田哲也, 武田伸一: モルフォリノが筋線維に取り込まれる分子機構の解明. 第 5 回 筋ジストロフィー治療研究発表会, 鳴子, 10.30, 2010

66) 王 博, 伊藤尚基, 兼先宏典, 川口奈奈子, 鈴木友子, 武田伸一: 筋ジストロフィーモデルマ

ウスからの iPS 細胞の誘導. 第 5 回 筋ジストロフィー治療研究発表会, 鳴子, 10.30, 2010

67) 武田伸一: 近未来に迫った筋ジストロフィー治療, 第 30 回全国筋ジストロフィー東京浅草大会 ~平成 22 年度患者と家族の研修会~, 東京, 10.8, 2010

68) 武田伸一: 筋ジストロフィー研究の最前線. 第 6 回国立精神・神経医療研究センター神経内科短期臨床研修セミナー, 東京, 7.14, 2010

69) 武田伸一: 筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究. 社団法人日本筋ジストロフィー協会 第 47 回全国大会, 新宿, 5.16, 2010

70) 武田伸一: 筋ジストロフィーに対する治療法の開発を目指して. 鍋島陽一教授退職記念シンポジウム. 京都, 5.9, 2010

71) 武田伸一: TMC (トランスレーショナル・メディカルセンター) について. 平成 22 年度国立精神・神経医療研究センター病院 新採用者オリエンテーション, 東京, 4.1, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特許出願:

発明の名称: 放射線照射コラーゲン様ペプチドを用いた核酸導入法

発明人: 野地澄晴、足立太郎

出願番号: 2010-172711

出願日: 2010年7月30日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告

マイオスタチン阻害ペプチドの臨床応用基盤の確立

研究分担者 砂田 芳秀

川崎医科大学 神経内科学 教授

研究要旨

マイオスタチンは骨格筋萎縮作用のある TGF- β ファミリー分子であり、マイオスタチン阻害戦略は筋ジストロフィー治療への応用が期待されている。我々はマイオスタチン転写活性についての *in vitro* アッセイシステムを開発し 29 アミノ酸から構成される特異的阻害ペプチドを同定し、その臨床応用に取り組んできた。今回マイオスタチンのみならず関連 TGF- β ファミリー分子に対する広範な阻害を目標として TGF- β タイプ I セリン・スレオニンキナーゼ膜受容体に対する低分子医薬 (Kid 化合物) に着目した。Kid 化合物経口投与によってカベオリン-3 欠損筋ジストロフィーモデルマウスの萎縮性ミオパチーは著明に改善し、野生型マウスの筋量筋力の増加が認められた、その分子機構として、①骨格筋の筋衛星細胞数を有意に増加させること、②マイオスタチン、アクチビン、TGF- β 1 による筋芽細胞分化抑制を強力に阻害することを明らかとした。今後はペプチド療法と共にこの低分子医薬の臨床応用に向けて検討を行う。

A. 研究目的

骨格筋特異的 TGF- β ファミリー分子であるマイオスタチンは、そのノックアウトマウスが著明な骨格筋肥大を呈することから、筋消耗性疾患の治療標的分子と考えられている。我々が作出したカベオリン-3 欠損肢帯筋ジストロフィー (LGMD) 1C モデルマウスは、著明な筋萎縮をその表現型とし骨格筋内マイオスタチンシグナルの活性化が認められ、マイオスタチン阻害によって筋萎縮が劇的に改善した。更に正常筋細胞ではカベオリン-3 はマイオスタチンシグナルを上流で抑制する分子であることが明らかとなった (Ohsawa Y., et al. J Clin Invest 116:2924-2934, 2006)。我々はこの LGMD1C マウスを動物モデルとして、まずマイオスタチン活性化阻害ペプチドを開発し臨床応用を目ざして本研究を進めてきた。

まずペプチド療法の候補として、我々はマイオスタチンプロドメインに着目した。プロドメインはマイオスタチンの N-末端約 250 アミノ酸から構成され、C-末端のマイオスタチン活性を強力に抑制する生理作用がある。我々はこれまでに、マイオスタチン刺激による HEK293 ヒト胎児腎細胞系を利用して *in vitro* のマイオスタチンアッセイ系を開発した。こ

の系にプロドメインの様々な領域に相当する合計 26 種類の cDNA を共発現してマイオスタチン活性を測定した。その結果、29 アミノ酸残基からなる特定の領域に強力なマイオスタチン活性阻害作用があることを発見した。これまでに、この領域に相当するペプチド (Rp29) を合成して LGMD1C モデルマウス骨格筋に局所投与を行い、*in vivo* のマイオスタチン活性阻害、筋萎縮性ミオパチーの改善を達成した。今回このペプチドの LGMD1C モデルマウス全身投与について取り組み、臨床応用の可能性を探った。

一方、マイオスタチンを含めた関連 TGF- β ファミリー分子に対する広範な阻害効果として、我々はマイオスタチンの細胞膜受容体である タイプ I セリン・スレオニンキナーゼ膜受容体 (ALK5) に対する低分子キナーゼ阻害剤 (T β RI kinase 阻害剤) に注目している。T β RI kinase 阻害剤はマイオスタチンのみでなくアクチビン、TGF- β 1 など関連 TGF- β ファミリー分子への広範な阻害作用があり、TGF- β 1 による癌促進作用に拮抗する分子標的治療医薬として世界中で様々な化合物が開発競争されている。我々はこれまでに、HEK293-pGL3-(CAGA)12 アッセイ系を用いて様々な T β RI kinase 阻害剤を検討しマイオスタチン活性阻害作用が最も強い化合物 (Ki) を選択

した。更にこの Ki 化合物の経口投与によって、LGMD1C モデルマウスでの骨格筋病変の改善作用が認められることを明らかとしてきた。本年度はこの化合物投与骨格筋解析及び化合物のマウス筋芽細胞 C2C12 分化系へ添加実験によって、なぜ筋量が増大し筋萎縮が改善するのかについての分子機構について検討を行った。

B. 研究方法

Rp-29 の筋ジストロフィーモデルマウス骨格筋への全身投与と解析

N-末端に細胞膜透過配列を付加した 29 アミノ酸残基から構成されるプロドメイン由来阻害ペプチド (Rp-29) を合成し、6 週齢 LGMD1C モデルマウスの腹腔内に週 3 回、合計 16 回の全身投与を行った。経時的に体重、筋力を評価し、7 週間後 (12 週齢) で骨格筋解析を行った (男女、各 n=7)。コントロールとして 29 アミノ酸残基の配列を逆向きに並べた Rev-Rp-29 を腹腔内投与した。筋萎縮の評価として単一筋線維断面積 (Single-myofiber area, SMA) を (1 個体あたり 2,000 筋線維, n=7) を統計学的に解析した。骨格筋総 RNA を単離してマイオスタチンの標的遺伝子である p21 の遺伝子発現について解析した。低分子 T β RI kinase 阻害剤投与による骨格筋筋衛星細胞の解析

Ki 化合物投与骨格筋 (LGMD1C モデルマウス、野生型マウス) の筋衛星細胞の動向についてマーカー蛋白質である M-cadherin 免疫染色によって解析した。

TGF- β 発現マウス筋芽細胞の樹立と低分子 T β RI kinase 阻害剤添加解析

我々は、東京大学医科学研究所北村俊雄博士が開発したレトロウイルス発現系を用いてマイオスタチン、アクチビン、TGF- β 1 を C2C12 筋芽細胞に高発現することに成功した。C2C12 筋芽細胞は低ウマ血清に交換することによって、次第に細胞膜が融合して多核となって、筋管細胞様に形態変化を起こし分化していくことが知られている。この *in vitro* 細胞融合・分化系に T β RI kinase 阻害剤である Ki 化合物を添加することによる筋融合及び

筋分化作用への影響について、解析を行った。まず Ki 化合物の濃度について条件設定を行い、0.5-30 μ M までは用量依存性に細胞融合・分化が促進することを確認した。20 μ M に条件を統一し、細胞形態、ライトギムザ染色による細胞融合指数 (fusion index) 解析を行った。次いで筋分化マーカーであるマイोजェニン (myogenin)、クレアチンキナーゼ (CK)、ミオシン重鎖 (MyHC) の発現について、免疫組織化学的に解析を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は、川崎医科大学の実験動物に関するガイドラインに従って行った。また、遺伝子組み換え実験については、川崎医科大学の規定に従い、許可を得て行った。

C. 研究結果

Rp-29 局所投与による LGMD1C モデルマウス筋萎縮性ミオパチーの改善

10 週齢 LGMD1C モデルマウスの腹腔内に Rp-29 ペプチド投与を行った。6 週間の検討ではコントロール (Rev-Rp-29) と比較して体重、筋力の増加は認められなかった。12 週齢では、各骨格筋重量、及び SMA の増大はなく、Rp-29 全身投与によって LGMD1C モデルマウスの筋萎縮性ミオパチーの改善は得られなかった。局所投与と異なり今回の全身投与ではマイオスタチン標的遺伝子である p21 の発現低下は得られなかった。

低分子 T β RI kinase 阻害剤投与による骨格筋筋衛星細胞の解析

LGMD1C モデルマウス及び野生型マウス骨格筋について、2 種類の M-cadherin 抗体によって筋衛星細胞数を解析した。Ki 化合物非投与群では野生型マウスと比較して LGMD1C モデルマウスでは筋線維あたりの筋衛星細胞数は有意に減少していた (3.64 vs. 5.19/100 fibers)。一方、Ki 化合物非投与群では、野生型マウス、LGMD1C モデルマウスとも有意に増加が認められた (8.66 及び 7.39/100 fibers)。

低分子 T β RI kinase 阻害剤によるマウス筋芽細胞融合・分化系促進

マイオスタチン、アクチビン、TGF- β 1 を C2C12 筋芽細胞に高発現させると、*in vitro* 細胞融合・分化系は著明に抑制された。一方この系に T β RI kinase 阻害剤 (Ki 化合物) を最終濃度 20 μ M となるように培養上清に添加したところ、コントロール C2C12 細胞とほぼ同等まで細胞融合・分化が回復した。

D. 考察

本年度はマイオスタチンに対する特異的阻害戦略として、プロドメインの阻害活性中心に相当する阻害ペプチドを全身投与してカベオリン-3 欠損筋ジストロフィー病変を改善するか否かについて検討した。昨年度の局所骨格筋投与の有効性から、全身投与でも筋萎縮性ミオパチーの改善が期待された。ところが 16 回の投与によって筋萎縮・筋力低下の改善は得られなかった。この原因として、マイオスタチンの骨格筋の標的分子である p21 発現減少が達成できなかったことから、全身投与によって、ペプチドが容易に分解を受ける、あるいはペプチドが骨格筋へ到達されていない等が想定される。そこで、今後は、ペプチドのアミノ酸組成を検討し分解を受けにくい構造に改変する、ビオチン化ペプチドを投与し体内動態を監視する等の検討によって、全身投与について再挑戦する。

一方、マイオスタチン及び関連 TGF- β ファミリー分子に対する広範な阻害として、T β RI kinase に対する分子標的治療法が考えられる。カベオリン-3 欠損筋ジストロフィーの筋萎縮筋力低下を改善することが示されていたがその分子機構は明らかではなかった。今回この阻害剤が、成人骨格筋の組織幹細胞である筋衛星細胞数を増加させること、広範な TGF- β ファミリー分子によるマウス筋芽細胞 C2C12 分化抑制を強力に阻害することを証明した。従ってこの阻害剤は、筋ジストロフィーのみでなくおそらく癌悪疫質などの筋消耗性疾患、正常人の老化による筋萎縮などでも、幹細胞レベル及び筋芽細胞レベルの双方で筋萎縮阻害作用を有すると考えられる。今後は長期投与の安全性も考慮した筋消耗性疾患に対する前臨床研究を検討する必要があると考えられる。

E. 結論

独自に開発したプロドメイン由来阻害ペプチドの全身投与によって、カベオリン-3 欠損筋ジストロフィーモデルマウスの筋病変改善に取り組んだ。また、マイオスタチン及び関連 TGF- β ファミリー分子を阻害する T β RI kinase 阻害剤によって筋衛星細胞数増加及び筋芽細胞の細胞融合及び筋細胞分化が促進することが示された。この阻害剤による筋消耗性疾患全般の治療の基盤が確立したものと考えられる。

F. 健康危険情報 該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hayashi S, Ohsawa Y, Takahashi T, Suzuki N, Okada T, Rikimaru M, Murakami T, Aoki M, Sunada Y : Rapid Screening for Japanese Dysferlinopathy by Fluorescent Primer Extension. *Int.Med.* 49, 2010

Nakatani M, Kokubo M, Ohsawa Y, Sunada Y, Tsuchida K. Follistatin-derived peptide expression in muscle decreases adipose tissue mass and prevents hepatic steatosis. *Am. J. Physiol. Endocrinol & Metabol.* 300 (3), E543-553, 2011

Kawakami E, Kinouchi N, Adachi T, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Tanaka E, Noji S. Atelocollagen-mediated systemic administration of myostatin targeting siRNA improves muscular atrophy in caveolin-3-deficient mice. *Dev Growth Differ.* 53(1):48-54, 2011

砂田芳秀:筋ジストロフィーの分子病態. 神経治療学, Vol.27, No.6, 781-784, 2010

2. 学会発表

Sunada Y, Ohsawa Y, Fujino M, Okada T, Hayashi S, Rikimaru M, Murakami T, Nishimatsu S, Nohno T, Nagao M : Wound-healing MRL-MpJ phenotype improves outcome of dystrophin deficient mdx mice. XII International Congress on Neuromuscular Diseases, Naples, Italy, 2010

砂田芳秀 : nNos は caveolin-3 欠損症の病態を抑制

する。第 51 回日本神経学会総会, 東京, 5.21.2010

砂田芳秀: 筋ジストロフィーの分子病態. 第 28 回日本神経治療学会総会, 横浜, 7.16.2010

砂田芳秀、大澤 裕、岡田只士、西松伸一郎、石崎雅俊、菅 智宏、内野 誠、濃野 勉、野地澄晴、土田邦博: 筋ジストロフィーに対する抗 myostatin 治療薬の開発, 厚生労働省精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究」平成 22 年度「砂田班」班会議, 東京, 12.3.2010

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
なし。